

DIE QUANTITATIVE BASENANALYSE
DER DESOXYRIBONUCLEINSÄURE VON
HOLOTHURIA TUBULOSA MITTELS
DER DÜNN SCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Manfred Rieger

1966



Aus dem Institut für vegetative Physiologie
der Universität Frankfurt am Main

(Direktor: Prof. Dr. E. Heinz)

DIE QUANTITATIVE BASENANALYSE DER DESOXYRIBO-
NUCLEINSÄURE VON HOLOTHURIA TUBULOSA MITTELS
DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von
Manfred Rieger
aus Wiesbaden

Frankfurt/M. 1965

Dekan : Professor Dr. O. Käser
Referent : Professor Dr. R. K. Zahn
Korreferent : Professor Dr. A. Wacker
Mündliche Prüfung : 9. Dezember 1966



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1 - 14
II. <u>QUANTITATIVE BASENANALYSE EINER HOLOTHURIA TUBULOSA DNA</u>	15 - 47
a. Die Vorteile der Dünnschichtchromatographie gegenüber der Papierchromatographie	15 - 16
b. Herstellung der Dünnschichtchromatogramme	16 - 17
c. Beurteilung der verschiedenen Schichten im Hinblick auf ihre Basentrennung	17 - 18
d. Hydrolyse, Auftragen und Konzentration	19 - 21
e. Fotografische Dokumentation der aufgetrennten Basen	22
f. Untersuchung der DNA auf verunreinigende Uracilspuren und Rechromatographie	22 - 23
g. Qualität der Dünnschichtchromatogramme im Hinblick auf ihre quantitative Trennung	24 - 25
h. Extraktionsmethode	25 - 29
i. Ausbeuteberechnung der Einzelbasen und des Gesamteichgemisches	29 - 33
j. Berechnung der Streuung	34
k. Vergleich der Streuung zwischen den mit der Ausstreich- und Sprühmethode hergestellten Platten	35 - 37
l. Berechnung und Streuungsberechnung des Basenquotienten und Basenkorrektur	37 - 45
m. Bestimmung des Stickstoff/Phosphorverhält- nisses der Holothuria tubulosa DNA	45 - 47
III. DISKUSSION	48 - 51
IV. ZUSAMMENFASSUNG	52
V. LITERATURANGABEN	53 - 54
VI. SYMBOLTABELLE	55 - 56



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546413_0044

I. EINLEITUNG

Die Anfänge ¹ der heutigen Nucleinsäureforschung gehen auf den Baseler Pathologen Johann Friedrich Miescher (1811 - 1887) zurück. Während seiner Studienzeit als Schüler Hoppe-Seylers in Tübingen (1868 - 1869) gelang es ihm, aus den Kernen von Eiterzellen einen Stoff zu isolieren, welchen er Nuclein nannte. Diese Substanz, die leicht in schwacher Base, dagegen nicht in schwacher Säure löslich war, war damals besonders auf Grund ihres hohen Phosphoranteiles interessant. Damit war neben dem bereits bekannten Lecithin das Nuclein als zweite organische Verbindung mit einem hohen Phosphoranteil entdeckt.

Nach Basel zurückgekehrt, gelang es Miescher in der Folgezeit aus Spermien des Rheinsalmes ein weiteres Nuclein zu gewinnen. Der Phosphoranteil dieses Stoffes betrug 9,59 Prozent. Nach dem Tode Mieschers prägte Altmann zum ersten Male den Begriff Nucleinsäure. Ihm gelang es, proteinfreie Nucleinsäuren aus Hefe und tierischem Material zu isolieren. Kossel und Neumann präparierten eine Nucleinsäure aus der Thymusdrüse. Nachdem jetzt die Möglichkeit bestand, aus verschiedenen Materialien Nucleinsäuren zu erhalten, war der Versuch, eine genauere Kenntnis über die chemische Zusammensetzung der Nucleinsäuren in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial durch die Analyse zu erhalten, eine natürliche Folgerung.

Die Entdeckung der Purinbasen Guanin und Hypoxanthin gelang zum ersten Male Piccard, der auf Anraten Mieschers diese Basen durch Säurehydrolyse darstellte. 1894 wurde von Kossel und Neumann das Thymin isoliert. 1900 fand Ascoli das Uracil, Kossel, Steudel und Levene folgten mit der Isolierung des Cytosins in den Jahren 1902 bis 1903 aus Thymusnucleinsäure. Nachdem Basen- und Säurekomponenten der Nucleinsäure gefunden waren, ließ die Entdeckung des Zuckeranteiles nicht mehr lange auf sich warten. So wurden durch Hydrolyse einer aus Hefezellen gewonnenen Nucleinsäure folgende Substanzen freigesetzt:

Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil, Phosphorsäure und Kohlenhydrat, das von Levene und Jakobs als Ribose erkannt wurde. Dagegen ergab die Hydrolyse einer aus Thymus gewonnenen Nucleinsäure zwei deutliche Abweichungen. Anstelle von Uracil fand man Thymin und der zuerst als eine Hexose gedeutete Zucker, konnte wiederum von Levene als Desoxyribose identifiziert werden. Somit waren zwei Nucleinsäuretypen gefunden, die sich sowohl in ihrer Basenzusammensetzung, als auch in ihrem Zuckeranteil voneinander unterschieden.

Daher ist es auch verständlich, daß man auf Grund der verschiedenen Zucker die aus Hefe Gewonnene "Ribonucleinsäure" und die aus Thymus Erhaltene "Desoxyribonucleinsäure" nannte. Die aus Vergleichen mit anderen Nucleinsäuren abgeleitete Folgerung allerdings, daß die Ribonucleinsäure nur in Pflanzen vorkomme, die Desoxyribonucleinsäure dagegen animalischen Ursprungs sei, war, wie durch spätere histochemische und spektrophotometrische Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden konnte, ein Fehlschluß.

Durch den von Brachet ausgearbeiteten Ribonucleasetest und die für die Desoxyribonucleinsäure spezifische Feulgen'sche Kernreaktion konnten beide Nucleinsäuretypen sowohl in pflanzlichem, als auch tierischem Material nachgewiesen werden. Allein die verschiedene Häufigkeit ihres Vorkommens in der Zelle gab Anlaß zu der Unterscheidung, daß die Ribonucleinsäure vorwiegend im Cytoplasma der Zelle zu finden ist, während der Zellkern die Desoxyribonucleinsäure enthält. Es soll aber nicht unerwähnt bleiben, daß auch wechselnde Mengen von Ribonucleinsäure in Zellkernen vorkommen. Die Nucleinsäuren bestehen aus Molekülverbänden, die drei verschiedenen Stoffklassen angehören. Dies sind die organischen Purin- und Pyrimidinbasen, die Ribose und Desoxyribose und endlich die Phosphorsäure. Diese drei vereinigen sich zu Nucleotiden.

Base + Zucker + Phosphorsäure = Nucleotid.

In der folgenden Tabelle sollen die bereits nachgewiesenen Bestandteile ² einer DNA und RNA noch einmal gegenübergestellt werden.

Nachgewiesene Bestandteile von Nucleinsäuren		
	RNA	DNA
Zucker	D-Ribose D-2-Methylribose ⁺	D-2-Desoxyribose
Phosphor	Phosphat	Phosphat
Basen		
Hauptkomponenten	Adenin (6-Aminopurin) Guanin (2-Amino-6-hydroxypurin) Cytosin (2-Hydroxy-4-aminopyrimidin) Uracil (2,4-Dihydroxypyrimidin)	Adenin Guanin Cytosin 5-Hydroxymethylcytosin Thymin (5-Methyluracil)
Spuren- oder Nebenkomenenten ⁺⁺	5-Ribosyluracil 6-Methylaminopurin 6-Dimethylaminopurin 2-Methyladenin 2-Methylamino-6-hydroxypurin 2-Dimethylamino-6-hydroxypurin Thymin 5-Methylcytosin	5-Methylcytosin 6-Methylaminopurin
Künstlich eingeführte Komponente	2-Thiouracil 8-Azaguanin 5-Fluoruracil	5-Chloruracil 5-Bromuracil 5-Joduracil 2-Amino-6-mercaptopurin

+ Nebenkomenente der RNA-Pentosen einiger Pflanzen.

++ Kommen offenbar nicht in pflanzlichen Viren vor.

Einige sind in s-RNA häufig, machen jedoch gewöhnlich nur 1 bis 2 Prozent aus.

Aus diesen Bausteinen können durch verschiedene Kombinationen die verschiedenen Nucleotide gebildet werden, die alle aufgefunden und inzwischen synthetisiert wurden.

Die DNA³ kann als Polynucleotid aufgefaßt werden (siehe Formel). Infolge ihres sehr hohen Molekulargewichtes müssen zahlreiche Nucleoside durch die Phosphorsäure in Diester-Bindung miteinander verknüpft sein. Die Phosphorsäure wird dabei die Hydroxyle 3' und 5' verbinden, da ja die Stellung 1' der Desoxyribose bereits durch die Base und die Stellung 4' vom furanoiden Ring besetzt ist.

Die RNA ist ähnlich aufgebaut wie die DNA. Auch hier liegt ausschließlich die 3 - 5 Verknüpfung vor. Diese chemische Primärstruktur wird ergänzt durch ganz bestimmte Sekundär- und Tertiärstrukturen, deren Ordnung sich in den makromolekularen Bereich erstreckt. Wie man heute weiß, paaren sich zum Beispiel in der DNA jeweils zwei Ketten so, daß zwei Basen durch Wasserstoff-Bindung miteinander gekoppelt sind. So nimmt man an, daß nur die Kombination zwischen einer Purin- und Pyrimidinbase, nämlich nur Thymin und Adenin und Cytosin und Guanin, solch eine Verbindung ermöglichen. Diese Hypothesen werden auch durch quantitative Analysen gestützt, welche gezeigt haben, daß bei der natürlichen und nativen DNA Adenin und Thymin und Guanin mit Cytosin im Molverhältnis 1 : 1 stehen.^{9,10} Eine Ausnahme bildet die DNA von Ø'x 174 und die einiger anderer kleinen Phagen.

Der Quotient $\frac{\text{Adenin} + \text{Thymin}}{\text{Guanin} + \text{Cytosin}}$ wird als Basenquotient bezeichnet.

5 Betrachtet man aber die bereits errechneten Basenquotienten verschiedener Tierspezies, so ergibt sich für die oben benannten spezifischen Basenpartner ein Asymmetrieverhältnis:^{11,12,13,14,15,16,17,18} Nach Ansicht Chargaffs ist gerade diese Asymmetrie des Basenquotienten für die einzelnen Tierarten charakteristisch. Bei vielen bereits durchgeführten Basenanalysen erhielt man einen Quotienten über 1. So errechnete man zum Beispiel für die den Holothuriern in der zoologischen Systematik nahestehenden Seeigel einen Asymmetriequotienten von 1,5 bis 1,8.

Das heißt also, daß bei der Analyse das Basenpaar Adenin und Thymin, Guanin und Cytosin überwog.

Dieses Verhältnis kann sich aber auch ins Gegenteil umkehren, wie durch Basenanalysen bei einigen Bakterien DNA gezeigt werden konnte (0,3 - 0,8).

Stellt man, wie Sueoka¹¹ das tat, die heute bekannten Analysen nebeneinander, so entsteht eine Pyramide. Im nachfolgenden Schema ist die Molsumme aus Guanin und Cytosin in Prozenten der Gesamtsumme angegeben.

Tabelle siehe nächste Seite

Zusammensetzung der DNA ¹¹ verschiedener Organismen, nach ihrem Gehalt an Guanin-Cytosin geordnet.

3-C %	Bakterien	Pilze Fungi	Algen Algae	Höhere Pflanzen	Wirbellose Tiere (Invertebrates)	Wirbeltiere (Vertebrates)
24 26 28 30	1 2, 3, 4, 5					
32 34 36 38 40	6, 7, 8, 9, 10 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 19, 20, 21, 22, 23 24, 25, 26, 27 28	101	201 202, 203	301 302, 303, 304, 305, 306, 307	401 402, 403 404, 405, 406 407, 408	501, 502
42 44 46 48 50	29, 30 31, 32 33 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40			308 309 310, 311	409, 410, 411 412	503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516
52 54 56 58 60	41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 49, 50 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59	102	204 205, 206 207			
62 64 66 68 70	60, 61 62, 63, 64 65, 66, 67, 68, 69		208 209 210			
72 74 76	70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78					

Erläuterung der in der Sueoka-Tabelle angegebenen Zahlen

Die in den einzelnen Spalten eingesetzten Zahlen symbolisieren die nachfolgenden Untersuchungsmaterialien. Zur besseren Übersicht wurden hierbei für die in der Spalte Bakterien untersuchten Desoxyribonucleinsäuren fortlaufende Zahlen von 1 - 78, für die Pilze Zahlen von 101 - 102, für die Algen Zahlen von 201 - 210, für die höheren Pflanzen Zahlen von 301 - 311, für die wirbellosen Tiere Zahlen von 401 - 412 und für die Spalte Wirbeltiere Zahlen von 501 - 516 gewählt.

Spalte Bakterien:

- | | |
|--|---|
| 1. <i>Welchia perfringens</i> | 2. <i>Clostridium perfringens</i> |
| 3. <i>Micrococcus pyogenes</i> | 4. <i>Plectridium saprogenes</i> |
| 5. <i>Ramibacterium ramosum</i> | 6. <i>Clostridium bifermentans</i> |
| 7. <i>Clostridium valerianicum</i> | 8. <i>Fusiformis fusiformis</i> |
| 9. <i>Rickettsia prowazeki</i> | 10. <i>Ristella clostridiformis</i> |
| 11. <i>Bacillus cereus</i> | 12. <i>Micrococcus asaccharolyticus</i> |
| 13. <i>Pasteurella tularensis</i> | 14. <i>Staphylococcus pyogenes</i> |
| 15. <i>Streptococcus faecalis</i> | 16. <i>Streptococcus fortidus</i> |
| 17. <i>Streptococcus pyogenes</i> | 18. <i>Streptococcus zymogenes</i> |
| 19. <i>Bacillus thuringiensis</i> | 20. <i>Pasteurella aviseptica</i> |
| 21. <i>Proteus vulgaris</i> | 22. <i>Veillonella parvula</i> |
| 23. <i>Micoplasma gallisepticum</i> | 24. <i>Bacillus megaterium</i> |
| 25. <i>Diplococcus pneumoniae</i> | 26. <i>Haemophilus influenzae</i> |
| 27. <i>Pasteurella bovisseptica</i> | 28. <i>Proteus vulgaris</i> |
| 29. <i>Bacillus subtilis</i> | 30. <i>Ristella insolita</i> |
| 31. <i>Rickettsia burneti</i> | 32. <i>Vibrio cholerae</i> |
| 33. <i>Corynebacterium acnes</i> | 34. <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |
| 35. <i>Neisseria meningitidis</i> | 36. <i>Salmonella enteritidis</i> |
| 37. <i>Salmonella gallinarum</i> | 38. <i>Salmonella paratyphi</i> |
| 39. <i>Salmonella typhimurium</i> | 40. <i>Shigella paradysenteriae</i> |
| 41. <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 42. <i>Escherichia coli</i> |
| 43. <i>Azotobacter agile</i> | 44. <i>Erwinia carotovora</i> |
| 45. <i>Proteus morganii</i> | 46. <i>Salmonella typhimurium</i> |
| 47. <i>Salmonella typhosa</i> | 48. <i>Shigella dysenteriae</i> |
| 49. <i>Aerobacter aerogenes</i> | 50. <i>Azotobacter vinelandii</i> |
| 51. <i>Aerobacter aerogenes</i> | 52. <i>Agrobacteria tumefaciens</i> |
| 53. <i>Azotobacter chroococcum</i> | 54. <i>Bifidobacterium bifidum</i> |
| 55. <i>Brucella abortus</i> | 56. <i>Corynebacterium parvum</i> |
| 57. <i>Fusiformis polymorphus</i> | 58. <i>Mycobacterium vadosum</i> |
| 59. <i>Serratia marcescens</i> | 60. <i>Pseudomonas fluorescens</i> |

- | | |
|--|--|
| 61. <i>Sarcina lutea</i> | 62. <i>Alcaligenes faecalis</i> |
| 63. <i>Mycobacterium phlei</i> | 64. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 65. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 66. <i>Pseudomonas saccharophila</i> |
| 67. <i>Pseudomonas tabaci</i> | 68. <i>Sarcina flava</i> |
| 69. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 70. <i>Micromonospora coelulea</i> |
| 71. <i>Micrococcus lysodeikticus</i> | 72. <i>Proactinomyces citreus</i> |
| 73. <i>Sarcina lutea</i> | 74. <i>Actinomyces globisporus flaveolus</i> |
| 75. <i>Actinomyces globisporus streptomycini</i> | 76. <i>Actinomyces griseus</i> |
| 77. <i>Actinomyces viridochromogenes</i> | 78. <i>Streptococcus griseus</i> |

Spalte Pilze:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 101. <i>Neurospora grassa</i> | 102. <i>Neurospora grassa</i> |
|-------------------------------|-------------------------------|

Spalte Algen:

- | | |
|---|--------------------------------------|
| 201. <i>Rhabdonema adriaticum</i> | 202. <i>Chaetoceros decipiens</i> |
| 203. <i>Thalassiosira Norden-scheldii</i> | 204. <i>Hydrodictyon reticulatum</i> |
| 205. <i>Ankistrodesmus</i> | 206. <i>Cystosira barbata</i> |
| 207. <i>Chlorella ellipsoidea</i> | 208. <i>Scenedesmus quadricauda</i> |
| 209. <i>Scenedesmus acuminatus</i> | 210. <i>Chlamydomonas reinhardi</i> |

Spalte Höhere Pflanzen:

- | | |
|--------------------------------|------------------------------|
| 301. <i>Allium cepa</i> | 302. <i>Salix caprea</i> |
| 303. <i>Papaver somniferum</i> | 304. <i>Curcubitæpepo</i> |
| 305. <i>Phaseolus vulgaris</i> | 306. <i>Pinus sibirica</i> |
| 307. <i>Arachis hypogaea</i> | 308. <i>Salix acubifolia</i> |
| 309. <i>Crylus avelana</i> | 310. <i>Alnus barbata</i> |
| 311. <i>Trifolium vulgare</i> | |

Spalte Wirbellose Tiere:

- | | |
|--|----------------------------|
| 401. Echinocardium cordatum | 402. Paracentrotus lividus |
| 403. Psammechinus miliaris | 404. Venus mercenaria |
| 405. Arbacia lixula | 406. Arbacia punctulata |
| 407. Cancer irroratus
(Hauptkomponente A) | 408. Echinus esculentus |
| 409. Cancer borealis
(Hauptkomponente A) | 410. Lumbricus terrestris |
| 411. Locusta migratoria | 412. Carcinus maenas |

Spalte Wirbeltiere:

- 501. Mensch (Thymus, Leber, Milz, Sperma)
- 502. Mensch (Nierenzellkultur)
- 503. Rind (Thymus, Milz, Leber, Pancreas, Niere, Testes, Sperma)
- 504. Schaf (Thymus, Leber, Milz, Sperma)
- 505. Schwein (Thymus, Leber, Milz, Thyreoidea)
- 506. Maus (Testes, Milz)
- 507. Ratte (Knochenmark)
- 508. Lachs (Sperma)
- 509. Forelle (Sperma)
- 510. Hering (Testes)
- 511. Alosa (Testes)
- 512. Rana pipiens (Testes)
- 513. Pferd (Milz)
- 514. Maus
- 515. Huhn (Erythrocyten, Eiklar)
- 516. Schildkröte (Erythrocyten)

In der rechten Spalte des Schemas führt Sueoka bisher bekannte Molsummen für Guanin und Cytosin der Wirbeltiere (Vertebrates) an.

Am Gipfel steht der Mensch mit den Primaten. In dieser Familie gibt es keine nennenswerte Speziesvariationen des Asymmetriequotienten. Bei den wirbellosen Tieren (Invertebrates) dagegen ist der Schwankungsbereich schon auffallender. Über Algen (Algae) und Pilze (Fungi) gelangen wir schließlich zur Basis der Sueoka-Pyramide, den Bakterien. Hier werden die weiten Variationen des Asymmetriequotienten besonders deutlich. Bei der einen Art werden zum Beispiel nur 26 Prozent Guanin und Cytosin festgestellt, bei der anderen dagegen 74 Prozent. Im letzten Fall kehrt sich dann der Basenquotient um und liegt nun unter 1. Daneben gibt es noch einige Individuen, zum Beispiel der Krebs (*cancer borealis*) mit 2 DNA-Arten. Ob die zweite DNA-Komponente vielleicht parasitären Zellen entstammt, ist noch nicht entschieden.

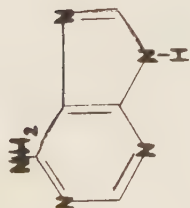
Die bereits ermittelten Basenquotienten und ihre tabellarische Erfassung ist noch sehr lückenhaft. So sind von dem Tierstamm Echinodermata (Stachelhäuer) bis vor kurzem (Literatur Zahn)⁴ die Holothuriidea (Seegurken) nicht untersucht worden. Dabei ist die Frage, inwieweit ihre DNA-Bruttozusammensetzung der mit ihnen im Unterstamm der Eleutherozoa vereinigten und bereits untersuchten Echinoidea (Seeigel), Asteroidea (Seesterne) und Ophiuroidea ähnelt, von großem systematischen Interesse. Für die nachfolgende quantitative Basenanalyse wurde *Holothuria tubulosa* verwendet. Ihre Stellung im Tierstamm der Echinodermata (Stachelhäuer) ergibt sich aus folgender Systematik:²⁴

- (Tierstamm) Echinodermata
- (Klasse) Echinozoa
- (Ordnung) Holothuriidea
- (Unterordnung) Actinopoda
- (Familie) Holothuriidae
- (Gattung) *Holothuria*
- (Art) *Holothuria tubulosa*

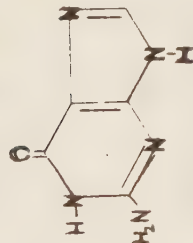
Base:

Purine

Adenin



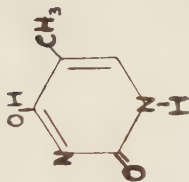
Guanin



Cytosin



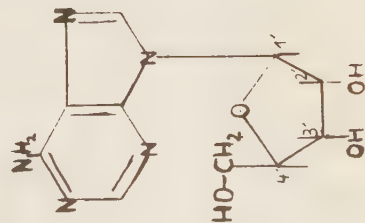
Thymin



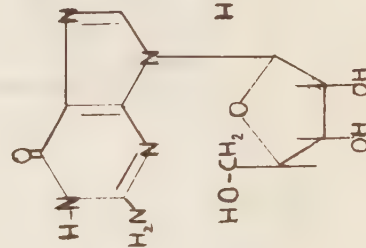
Uracil



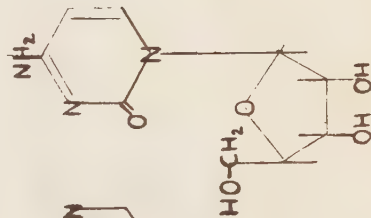
Adenosin



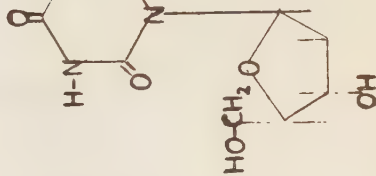
Guanosin



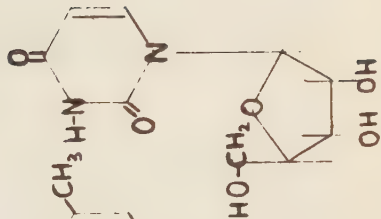
Cytidin



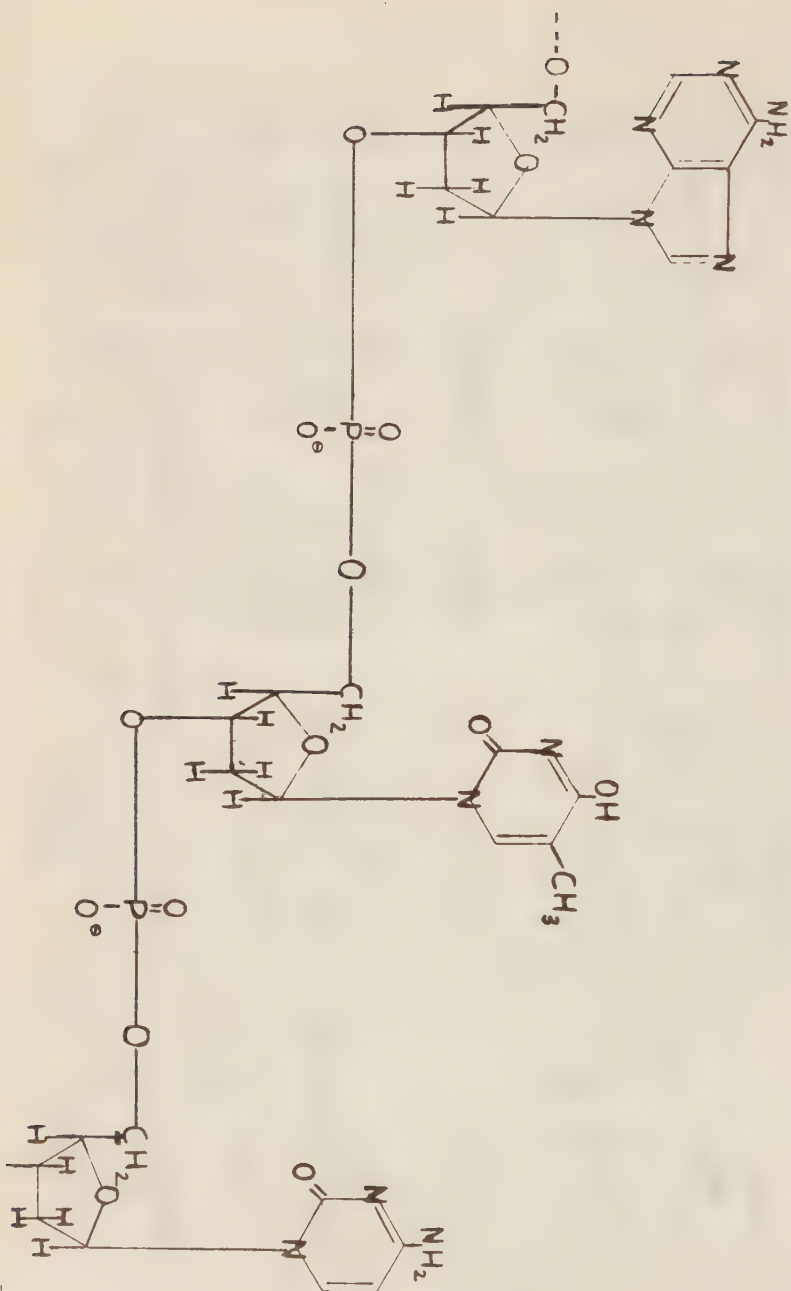
Thymidin



Uridin



-----Ausschnitt aus der hypothetischen Kette einer Desoxyribonucleinsäure.-----³



Diese an der nördlichen Küste der Adria in 6 Meter Tiefe²⁵ vorkommende Art ist ein sehr geeignetes Untersuchungsobjekt. Die Gonaden reifer Tiere können, ohne daß bei diesem Eingriff die Tiere getötet werden müssen, mit dem Messer herauspräpariert werden.

Vorgreifend soll an dieser Stelle der Versuch gemacht werden, die von uns analysierte *Holothuria tubulosa* in das Sueoka-Schema einzureihen, Zunächst wurde aus der Tabelle Seite 40 und 41 für jeden einzelnen Versuch (siehe fortlaufende Nummern) die Summe von Guanin und Cytosin in Prozenten angegeben. Aus den 34 Summen der Mittelwert von G und C gebildet und die Streuung nach folgender Formel berechnet. (Formel Seite 14)

Ergebnis der Streuungsberechnung:

$$s^2 = \frac{1}{33} (55570 - 40,45 \times 1372)$$

$$s^2 = \frac{1}{33} (55570 - 55362,2)$$

$$s^2 = \frac{1}{33} (207,8)$$

$$s^2 = 6,3$$

$$s^2 = \pm 2,51$$

$$\bar{x} = 40,35 \pm 2,51$$

Im Sueoka-Schema werden für die wirbellosen Tiere (Invertebrates) Summen von Guanin und Cytosin zwischen 34 und 44 Prozent angegeben. Der für die *Holothuria tubulosa* ermittelte Wert von $40,35 \pm 2,51$ Prozent reiht sich dann in die Mitte der Invertebrates-Spalte ein.

Berechnung der Streuung

$$s^2 = \frac{1}{N-1} \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 - \bar{x} \sum_{i=1}^N x_i \right); \quad \bar{x} = \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^N x_i \right)$$

Anzahl der Werte	N	34
Summe der Werte	$\sum_{i=1}^N x_i$	1372
Mittelwert	$\bar{x}$	40,35
Quadratsumme der Werte	$\sum_{i=1}^N x_i^2$	55570
Produkt aus Mittelwert und Summe der Werte	$\bar{x} \sum_{i=1}^N x_i$	55362,2
Produkt aus Quadrat- summe der Streuung und Anzahl der s ² Werte - 1	(N-1)	207,9
Quadrat der Streuung	s ²	6,2

II. QUANTITATIVE BASENANALYSE EINER HOLOTHURIA TUBULOSA-DNA

a. Die Vorteile der Dünnschichtchromatographie gegenüber der Papierchromatographie.

Nachdem in letzter Zeit die Dünnschichtchromatographie^{12,13,14} mit ihren großen Anwendungsaussichten mehr und mehr zur Verwendung gekommen ist, bestand ein verständliches Interesse darin, die Anwendungsmöglichkeit der Dünnschichtchromatographie im Hinblick auf eine quantitative Basenanalyse bei einer bisher noch nicht untersuchten DNA-Art zu überprüfen. Dies war um so mehr erforderlich, als die vorhergegangenen Basenanalysen anderer DNA unseres Arbeitskreises mit den üblichen relativ hohen Streuungen der Meßwerte behaftet waren. Hinzu kam die relative Aufwendigkeit dieser Methode. Waren doch große Chromatographiegefäße und lange Laufzeiten (24 bis 48 Stunden) zur Entwicklung eines Papierchromatogrammes erforderlich. Dazu kamen die oft sehr unterschiedlichen Eigenschaften des säuregewaschenen Chromatographiepapierses, sowie die Großflächigkeit des Auftragspunktes und die durch die Papierfasern verursachten zusätzlichen Verzerrungen bei der Entwicklung. Unangenehm ist auch der umständliche und langwierige Trocknungsprozeß und die kostspielige Dokumentation mit dem Photoprintverfahren.

Dagegen hat die Dünnschichtchromatographie folgende Vorteile:

1. Die Raumersparnis durch die kleinen Chromatographiekammern,
2. die dadurch verbundene Möglichkeit der Parallelentwicklung vieler Versuche zur gleichen Zeit,
3. das kleine Format des Dünnschichtchromatogrammes bei hoher Auflösung,
4. der bis auf Quadratmillimeter reduzierbare Auftragspunkt,
5. die kurze Entwicklungszeit von nur 4 - 5 Stunden,
6. die schnelle Dokumentation der aufgetrennten Substanzen durch die Direktphotographie,

7. die bedeutende Materialersparnis durch Wiederverwendung der gebrauchten, gereinigten Glasplatten,
8. die günstige Aufbewahrung derselben in Plattenschränken.

So wurde ich mit der quantitativen Basenanalyse der DNA aus den Spermatozoen von *Holothuria tubulosa* unter Verwendung der Dünnschichtchromatographie betraut.

b. Herstellung der Dünnschichtchromatogramme ^{15,16}

Vier Glasplatten der Maße 20 x 20 cm wurden dreimal mit Detergens gereinigt und mehrfach mit Aqua-bidest überspült. Danach mit einem Leinentuch gründlich getrocknet (Vermeiden von Fusseln). Kurz vor dem Auftragen wurden die Platten nochmals zweimal mit Chloroform abgerieben, um letzte Fettspuren von den Platten zu beseitigen. Die Desaga-Auftragsplatte mußte dabei in eine absolut waagrechte Lage gebracht werden. Dann wurden die Glasplatten auf die Auftragsplatte gelegt und darauf geachtet, daß jede Platte gut mit der benachbarten abschloß. Jegliche Unebenheit mußte dabei vermieden werden und nur eine genaue waagrechte Lage garantiert gleichmäßige Schichten. Ebenfalls ist auf eine stoß- und erschütterungsfreie Lage während der Abbindezeit zu achten.

Die Streichmasse wurde nach Firmenanleitung (Firma Macherey & Nagel & Co., Düren) hergestellt. Dabei wurden 15 g Cellulose MN-300 Pulver mit 90 ml Wasser verrührt. Dieses Volumen ermöglicht den Guß von 4 Dünnschichtplatten von 1/2 mm Schichtdicke. Da wir in einem Arbeitsgang mehrere Platten herstellten, rührten wir unter Wahrung der Standardrelation (15 g MN-300 Cellulose Pulver auf 90 ml Wasser) immer ein größeres Volumen an. (45 g MN-300 auf 270 ml Wasser).

Da das Cellulose MN-300 Pulver ohne jegliche Bindemittel (zum Beispiel Gipszusatz) gut abbindet, konnte der Gießprozeß, wenn erforderlich, zeitlich hinausgezögert werden. Dann empfiehlt sich aber, die Streichmasse mit einem Magnet-·rührer ständig umzurühren. Dieser letzte Schritt war auch noch aus anderen Gründen nützlich.

Es zeigten sich immer wieder leichte Verunreinigungen des Cellulosepulvers, die aber mit Hilfe eines Pelëus-Balles bei diesem Schritt gut abpipettiert werden konnten.

Die nach Firmenanleitung vorbereitete und im Mixer gründlich eine Minute lang homogenisierte Streichmasse konnte anschließend in das Streichgerät gegeben werden. Das gefüllte Desaga-Gerät (90 ml) wurde dann gleichmäßig über die Platten hinweggezogen und so die Schichten gegossen. Nach 5 Minuten Abbindezeit trocknete man die Platten 40 Minuten lang in einem Wärmeschrank bei 50 ° C. Dabei wurde eine schonende Trocknung im Gegensatz zu der in der Literatur angegebenen Trocknung von 10 Minuten bei 105 ° C bevorzugt. Der Gießvorgang für 4 Platten dauerte ungefähr 4 sec.

c. Beurteilung der verschiedenen Schichten im Hinblick auf ihre Basentrennung.

Um optimale Trennungen der Basen zu erreichen, mußten im Laufe der Zeit verschiedene im Handel befindliche Schichtungsmittel erprobt werden. So wurden für unsere Versuche ionenaustauschende (Ecteola und DEAE)¹², anorganische (Kieselgel-G) und organische Schichten (Cellulose MN-300) auf ihre Trennfähigkeit getestet. Dabei ergab sich, daß trotz anderslautenden Literaturangaben Ecteola und Kieselgel-G mit folgenden Lösungsmitteln: Wasser, 1 n - HCl, Na Cl und Wyatt-Gemisch nicht trennten. Das Scheitern dieser Versuche ist auch dadurch erklärlich, daß gerade die Purinbasen Adenin und Guanin im neutralen und alkalischen Bereich schwer löslich sind. Dagegen konnte Guanin in 1 n - HCl relativ gut gelöst werden. Ecteola zeigte schon beim Auftragen der Streichmasse lästige Mizellbildungen. DEAE-Cellulose trennte mit Wyatt-Gemisch unvollkommen. Dagegen konnten schon gleich zu Beginn der Versuche mit MN-300 Cellulosepulver und Wyatt-Gemisch als Lösungsmittel brauchbare Trennungen erzielt werden.

Die komplikationslose qualitative Reproduzierbarkeit der Trennungen an der Celluloseschicht im Wyatt-Gemisch veranlaßte uns, die Methodik beizubehalten und zu verbessern. Bei Beurteilung der ersten entwickelten Platten mußte festgestellt werden, daß die Positionen der Basen Guanin und Adenin ineinander übergingen. Dadurch war zunächst eine saubere Abgrenzung der Flecken untereinander unmöglich.

So wurde durch Veränderung des Wyatt-Gemisches versucht, im Guanin-Adenin-Bereich klarer aufzutrennen. Dies konnte durch Korrektur der Azidität des Wyatt-Gemisches erreicht werden. Es mußte dabei beachtet werden, daß in Lösungsmitteln, welche stärker als 1 n - HCl sind, Adenin viel langsamer als Cytosin wandert. So wurde die anfänglich hemmende Azidität des alten Wyatt-Gemisches¹⁷ durch zusätzliche Wasserzugabe beseitigt und so eine klare Trennung zwischen Purin- und Pyrimidinbasen erreicht.

Die Chromatographiekammern standen während der Entwicklung der Platten in einem thermostatisch geregelten Raum. Alle Versuche wurden bei 21° C vorgenommen.

Zusammensetzung:

Original-Wyatt-Gemisch:	165 ml Isopropanol (99 %-ig)
	65 ml 25 %-ige HCl
	20 ml H ₂ O

Modifiziertes Gemisch:	165 ml Isopropanol (99 %-ig)
	50 ml 25 %-ige HCl
	50 ml H ₂ O

d. Hydrolyse, Auftragen und Konzentration

Die Hydrolyse der gereinigten *Holothuria-tubulosa*-DNA wurde nach einer Vorschrift Wyatts¹ durchgeführt. Dabei erschien uns die Hydrolyse mit 98 %-iger Ameisensäure geeigneter, als die mit Perchlorsäure im Wasserbad. Es wurden ca. 30 mg DNA mit 0,5 ml 98 %-iger Ameisensäure in einer 25 ml Ampulle 40 Minuten lang bei 175° C in einem Wärmeschrank inkubiert. Dann wurde die Ampulle in eine Trockeneis-Acetonmischung gebracht und bei - 90° C gefroren. Dies geschieht, um den hohen Binnendruck infolge CO-Bildung, sowie das Aufschäumen bei Druckausgleich, zu vermeiden. Es folgte, nachdem der Hals der Ampulle mit einem Glasschneider leicht angeritzt worden war, das Absprengen des Halses mit einem glühenden Glasstab. Das Hydrolysat wurde anschließend gefriergetrocknet und dabei die Ameisensäure abgepumpt. Anschließend wurde so mit 1 n - HCl verdünnt, daß in 0,01 ml 100×10^{-6} g Äquivalente Substanz enthalten waren.

Das Auftragen des Hydrolysates und Eichgemisches wurde mit einer Mikrospritze vorgenommen ("Agla" - Firma Burrouhs-Wellcome & Co. London). Beim Auftragen der Substanz auf die Celluloseschicht erwies sich die graduierte Agla-Spritze als sehr nützlich. Mit ihr konnten bei einer Gesamtkonzentration von 100×10^{-6} g bis zu 10^{-6} g Genauigkeit aufgetragen werden. Um beim Beschicken der Platten weitere Verunreinigungen (zum Beispiel durch Metallspuren) zu vermeiden, wurde auf Stahlkanülen verzichtet und fein ausgezogene Plastikkanülen verwendet.

Die Spritze wurde fest in eine Stativklammer eingespannt. Danach markierte man auf der Plattenbasis in einem Abstand von 3 cm kleine punktförmige Auftragepunkte. Die Plastikkanüle der Mikrospritze wurde nun so gesenkt, daß die Kanülenspitze genau im Zentrum des Auftragepunktes zu liegen kam. Dabei durfte aber die Schicht nicht verletzt werden. Nachdem die Spritze fixiert war und ein auf einem anderen Stativ befestigter Föhn seinen geheizten Luftstrahl

direkt auf den Auftragepunkt richtete, konnte nun der Auftrageprozeß begonnen werden. Es wurde immer darauf geachtet, daß der Durchmesser des Auftragepunktes 0,3 cm nicht überschritt.

Das Auftragen wurde in unserem Falle manuell durchgeführt, um stets einen konstanten Durchmesser des Auftragepunktes zu erhalten. Automatisches Auftragen bei konstantem Schub und größerem Fleckendurchmesser ist ebenfalls möglich. Die Mikrospritze Agla weist eine entsprechende Kopplungsvorrichtung auf und kann mit einem niedrigtourigen Elektromotor betrieben werden.

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde anschließend die günstigste Auftragekonzentration ermittelt. Diese liegt bei 100×10^{-6} g Basengemisch pro Auftragefleck. In einer weiteren Versuchsfolge wurde nun die Auftragekonzentration über 50, 20, 15, 10, 8, 6, 4, 2, und einmal 10^{-6} g verringert, und somit die untere Sichtbarkeitsgrenze für nur eine Substanz (in unserem Falle 5-Methyl-Cytosin) ermittelt. Diese untere Sichtbarkeitsgrenze lag bei 4×10^{-6} g. Alle Konzentrationen unter 4×10^{-6} g pro Auftragepunkt und für nur eine Substanz blieben auf der Dünnschicht unsichtbar.

Sichtbar gemacht wurde mit einer UV-Lampe bei 260 m μ . Eine entwickelte und mit UV-Lampe bestrahlte Platte zeigte die getrennten Substanzen als dunkelblaue Flecken auf hellblauem Hintergrund. Diese Flecken waren scharf vom Hintergrund abgrenzbar.

Die Sichtbarmachung und Markierung der Flecken auf der Glasplatte bereitete aber zunächst dadurch Schwierigkeiten, daß die meisten durchsichtigen Körper, so auch Glas, die ultravioletten Strahlen stark absorbieren. Aus diesem Grund mußte bei der Sichtbarmachung der Substanzen die Celluloseschicht direkt der UV-Lampe gegenüber liegen. Dann konnten die Flecken auch von der hinteren und nicht beschickten Plattenseite mit dem Auge gut wahrgenommen und leicht von unten her markiert werden.

Die Markierung geschah mit einem spitzen Bleistift oder Glasspatel. Die dabei auftretenden Graphitspuren erwiesen sich bei der Extraktion als nicht störend und ergaben keine Verfälschungen der Extinktionen.

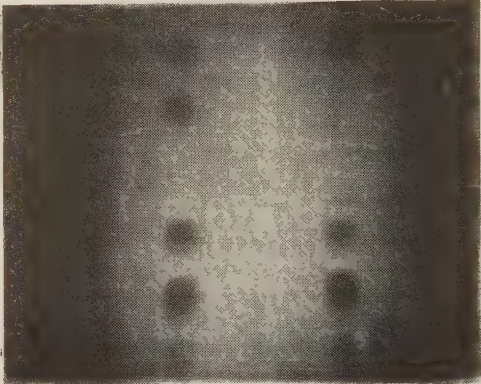
Die fotografische Dokumentation der Dünnschichtchromatogramme bei UV-Licht gelang mit einer Polaroid-Camera unter Vorsatz eines Gelbfilters. Die Belichtungszeit einer Nahaufnahme (Abstand 12 cm) betrug 7 Sekunden. Das Ergebnis dieser Versuche waren saubere Fotografien bei klaren Trennungen. Die einzelnen Positionen der aufgetrennten Substanzen waren in Wanderrichtung:

Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin.

Am Anfang wurde die genaue Markierung des Thyminfleckens durch eine starke Verunreinigung der Celluloseschicht behindert. Diese Verunreinigung im oberen Chromatogrammbereich (Thyminbereich) konnte aber von uns durch einen Vorwaschprozeß der Chromatogramplatte auf ein Minimum reduziert werden. So wurde jede Platte zunächst unbeschickt mit Wyatt-Gemisch vorgewaschen. Am oberen Pol der Platte trat nach 10 Stunden Vorwaschprozeß ein gelblicher, gelappter Streifen auf. Die Platten wurden danach aus den Kammern entnommen, gut getrocknet und das verunreinigte Gebiet zwei Zentimeter vom oberen Pol der Platte abgekratzt. Anschließend konnte aufgetragen werden, und nun war nach 4 Stunden Laufzeit der Thyminfleck klar von seiner Umgebung abgrenzbar.

e. Fotografische Dokumentation der aufgetrennten Basen.

<u>Position:</u>	<u>Aufnahme</u>
Thymin	Darstellung der getrennten Basen Vorsatz von 1 Gelbfilter Belichtungszeit: 7 sec. Abstand: 12 cm
Uracil	
Cytosin	
Adenin	
Guanin	



Eichgemisch DNA-Hydrolysat

f. Untersuchung der DNA auf verunreinigende Uracilspuren und Rechromatographie.

Mittels der Dünnschichtchromatographie war es auch möglich, eventuelle Verunreinigungen der *Holothuria* DNA speziell durch noch vorhandene RNA festzustellen. Die entwickelten Dünnschichtchromatogramme wurden deshalb nach Uracilspuren untersucht. Aus diesem Grunde wurden zu den anderen Basenanteilen des Eichgemisches auch ein Aliquot Uracil mit eingewogen. Die Position des Uracil-Fleckens lag nach vollständiger Trennung des Eichgemisches zwischen Cytosin und Thymin (s. Fotografie). Es konnten aber selbst bei genauester Inspektion der Chromatogramplatten im Bereich des aufgetrennten Hydrolysates keine Uracilspuren nachgewiesen werden. Auch ein speziell zu dieser Fragestellung entwickeltes Rechromatographieverfahren

konnte beweisen, daß es sich bei den aufgetrennten Substanzen nur um Cytosin und Thymin, nicht aber um Uracil handelte. Zur Beantwortung dieser Frage wurde der Bereich zwischen Cytosin und Thymin sauber ausgetrennt und erneut extrahiert. Es kamen insgesamt drei Platten zur Auswertung. Auf jeder Platte wurden 50×10^{-6} g, 60×10^{-6} g und 70×10^{-6} g Eichgemisch aufgetragen, so daß zum Beispiel bei 50×10^{-6} g Ausgangskonzentration auf die beiden Basen Cytosin und Thymin 25×10^{-6} g Basenanteile entfielen.

Bei 60×10^{-6} g Ausgangskonzentration 30×10^{-6} g und bei 70×10^{-6} g Ausgangskonzentration 35×10^{-6} g.

Das ergab für drei ausgewertete Platten folgende Konzentrationen:

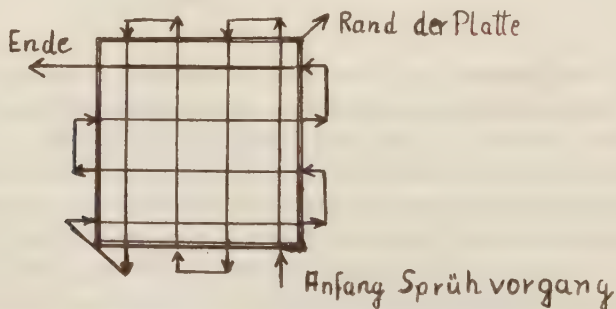
50×10^{-6} g Ausgangskonzentration	$= 3 \times 25 \times 10^{-6}$ g	$= 75 \times 10^{-6}$ g
60×10^{-6} g Ausgangskonzentration	$= 3 \times 30 \times 10^{-6}$ g	$= 90 \times 10^{-6}$ g
70×10^{-6} g Ausgangskonzentration	$= 3 \times 35 \times 10^{-6}$ g	$= 105 \times 10^{-6}$ g
Gesamt		270×10^{-6} g Basenanteile

Waren Uracilspuren im Hydrolysat vorhanden, so konnten diese nach Entwicklung nur im Bereich zwischen Cytosin und Thymin gefunden werden (s. Position Uracil im Eichgemisch). Die nach Extraktion dieses Gebietes aufgetretene Verdünnung wurde durch Einschränkung des Eluats auf die Hälfte und Auftragen größerer Volumina kompensiert. In gleicher Weise wurde das Rechromatographieverfahren dazu herangezogen, um etwaige 5-Methyl-Cytosinspuren nachzuweisen. Es konnte abermals bewiesen werden, daß 5-Methyl-Cytosin nicht im Hydrolysat vorhanden war. Wir nehmen daher an, daß sich die untersuchte Holothuria DNA nur aus den vier Basen Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin zusammensetzt.

g. Qualität der Dünnschichtchromatogramme im Hinblick auf ihre quantitative Trennung.

Die Qualität der Dünnschichtchromatogramme im Hinblick auf ihre quantitative Trennung wurde ebenfalls untersucht. Zur Herstellung der Dünnschichtplatten wurden das Desaga-Streichgerät und eine Sprühmethodik mit Hilfe einer Sprühpistole herangezogen. Dieses Sprüngerät nach B. Sutter (Firma Hormuth-Vetter, Wiesloch/Baden) ist in seiner Handhabung besonders praktisch. Die Herstellung der Cellulosemasse entspricht dem von der Firma Machery & Naegeli angegebenen Mischungsverhältnis. (15 g Cellulose MN-300 auf 90 ml Wasser). Die Cellulosemasse wird, nachdem das Gerät an eine Druckpumpe angeschlossen ist, im Abstand von 40 cm von der Platte bei 1 bis 1,5 Atü aufgesprüht. Schwierigkeiten bereitete die regelmäßige Führung der Sprühpistole während der Plattenherstellung. Diese Führung muß in konstanten gegeneinander parallel verschobenen Abständen erfolgen, so daß sich genau Streifen an Streifen anreihen.

(s. Zeichnung)



Der Vorteil der Sprühmethode bestand in der angenehmen Wartung des Gerätes. Die Sprühpistole mußte erst gegen Ende der Plattenherstellung gründlich gesäubert werden. Dagegen wurde die Desaga-Auftragsplatte und der Schlitten nach jedem Gießprozeß (Herstellung von nur 4 Platten) sofort gereinigt.

Es fiel auf, daß die Platten, welche mit der Sprühmethode hergestellt waren, quantitativ weniger gut trennten. Dies mag auf ihre nicht genau definierte Schichtdicke zurückzuführen sein. Dagegen ließen sich durch exakte Einstellung der Spaltbreite beim Desaga-Streichgerät gut definierte Schichtdicken gießen. Diese mit dem Desaga-Streichgerät hergestellten Platten ergaben auch bessere Trennungen. So wird man in Zukunft die etwas aufwendigere Methode mit dem Desaga-Streichgerät der schnelleren aber mit mehr Fehlern behafteten Sprühmethode vorziehen müssen.

h. Extraktionsmethoden

Die aufgetrennten Basen konnten wie beschrieben direkt unter der UV-Lampe umfahren und auf diese Weise markiert werden. Um aber die so markierten Flecken extrahieren zu können, mußten sie vorher mit einem Glasspatel oder in unserem Falle mit einem Kunststoffblättchen (Kragenstäbchen) von der Platte gekratzt werden. Für die nachfolgende Extraktion standen zwei Methoden zur Verfügung:

1. Überführen der ausgekratzten Flecken in ein Zentrifugenglas und direkte Zugabe des gesamten Extraktionsmittels (3 ml 1 n - HCl) oder
2. die stufenweise Säulenextraktion im Überstand.

Beide Verfahren kamen zur Anwendung und wurden auf ihre Genauigkeit untersucht. Dabei ergab sich, daß das direkte nicht gestufte Verfahren weniger genau, als die stufenweise Extraktion arbeitete.

Bei der stufenweisen Extraktion konnte man im Überstand extrahieren und somit durch ständiges Ablassen des Überstandes und Nachfüllen mit Eluens immer wieder eine neue Sättigung erreichen.

Bei der alten Methode wurden die Flecken von der Platte gekratzt und in ein Zentrifugenglas überführt. Danach pipettierte man 3 ml 1 n - HCl hinzu. Es wurde so lange geschüttelt, bis keine Celluloseflocken mehr sichtbar waren. Das so erhaltene milchigtrübe Eluat wurde über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag zentrifugierte man die Celluloserückstände 10 Minuten lang bei 6000 x g. Der klare Überstand wurde dann in eine Küvette eingebracht und anschließend im Beckman-Spectralphotometer die Extinktion gemessen.

Bei der stufenweisen Säulenextraktion wird der Fleck wie im ersten Fall mit einem Kunststoffblättchen ausgekratzt und die Cellulosekrümel zunächst auf der Platte belassen. Danach eine mit Glaswolle ausgestopfte und mit 1 n - HCl vorgewaschene Säule an eine Wasserstrahlpumpe gehängt. So konnten die ausgekratzten Flecken nach Prinzip eines Staubsaugers annähernd verlustfrei in die Säule eingebracht werden. Zur Reinigung der mit Glaswolle gestopften Säulen bediente man sich der auf Seite dargestellten Anordnung. Mit Hilfe dieser Einrichtung konnten die Säulen über Nacht gründlich vorgewaschen und damit gereinigt werden. Zur eigentlichen Extraktion erwies sich die in Abbildung dargelegte Methode als unpraktisch. Die sich über mehrere Stunden hinziehende Extraktion (18 - 24 Stunden) im Überstand und relativ kleinem Volumen (3 ml) war mit dem ständigen Zufluß schwer zu vereinbaren. Aus oben angeführten Gründen wurde deshalb das Eluens in Intervallen mit der Hand einpipettiert. Man ging dabei wie folgt vor:

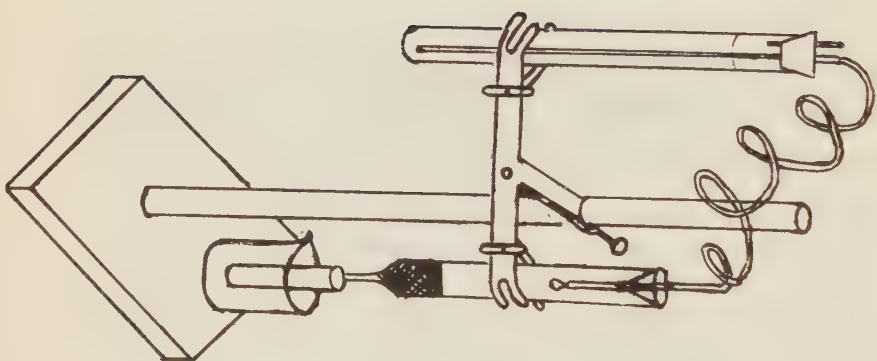
1 ml Eluens wurde in die Säule einpipettiert und das Volumen über Nacht dort belassen. Am nächsten Morgen wurde der Überstand in ein markiertes Zentrifugenglas (3 ml Marke) abgelassen und danach alle zwei Stunden mit 0,5 ml 1 n - HCl im Überstand nachextrahiert. Der Gesamtdurchmesser der Säulen betrug 8 mm. Die Höhe ungefähr 22 cm.

Eine nach diesem Arbeitsgang nochmals durchgeführte Säulenextraktion ergab für die einzelnen Substanzen Extinktionen, die unter denen der Leerwerte lagen, womit die quantitative Säulenextraktion bewiesen ist.

Beispiel einer am 6.11.1963 durchgeführten Nachextraktion

Base	gemessene Extinktion	gemessene Leerwerts- Extinktion	gemessene Extinktion der Nachextraktion
Guanin	0,262	0,047	0,027
Adenin	0,309	0,024	0,016
Thymin	0,209	0,056	0,013
Cytosin	0,243	0,040	0,018

Modell zum Vorwaschen der Säulen



Die Basen zusammen bei einer Wellenlänge, in unserem Falle 260 my, gemessen zeigten additives Verhalten. Der Nachweis, daß es sich im Eluat um die angeführten vier Standardbasen handelte, konnte noch zusätzlich durch Schreiben der Spektrogramme geführt werden. Hierbei wurde nach Extraktion der Flecken das Eluat in eine Küvette gegeben und in einem von der Firma Zeiss entwickelten Spektrographen (Typ: RPQ 20 AV) das Spektrum jeder Substanz im Bereich zwischen 310 my und 210 my geschrieben. Dadurch, daß die Spektren der einzelnen Basen übereinandergeschrieben wurden, ließen diese sich auf Grund ihrer verschiedenen Extinktionsmaxima gut voneinander abgrenzen. Diese Extinktionsmaxima für die einzelnen Basen stimmen auch mit denen in der Literatur angegebenen überein.

i. Ausbeuteberechnung der Einzelbasen und des Gesamt-eichgemisches.

Nachdem die genaue Arbeitsweise der MN-300 Cellulose gesichert war (wie oben beschrieben), ergab sich die Frage nach der quantitativen Arbeitsweise. Diese Versuche und die damit verbundenen Ausbeuteberechnungen wurden an den einzelnen Basen und einem Gemisch aus diesen durchgeführt. So wurden jeweils 10 mg Base eingewogen und in 10 ml 1 - n HCl gelöst. Nach längerem Schütteln und kurzem Erwärmen konnten die Basen gut gelöst werden. Mit der Agla-Spritze wurden 0,01 ml in einem Punkt aufgetragen, was einer Auftragekonzentration von 10×10^{-6} g entsprach. Der Nachweis, daß die Basen auch völlig gelöst waren, konnte photometrisch erbracht werden. Nur mußten dabei die Basen zwecks photometrischer Extinktionsbestimmung so verdünnt werden, daß sie in dem Meßbereich des Beckman-Spektralphotometers lagen. Die Extinktion für 1×10^{-6} g Base pro ml lag zum Beispiel für Adenin bei 0,102. Demzufolge ist für 20×10^{-6} g Adenin pro ml eine Extinktion von 2,040 zu erwarten. Dieser Wert liegt aber schon etwas außerhalb des günstigen Meßbereiches des Beckman-Spektral-photometers.

	<u>Ext.</u>		<u>Ext.</u>
Meßbereich	=	0,000	- 2,0

Es mußten daher die gelösten Basen von der Konzentration 1 mg pro ml so verdünnt werden, daß wir unsere Bestimmungen im Meßbereich des Beckman-Spektralphotometers vornehmen konnten. Dies war, da die Extinktion für 10^{-6} g pro ml der anderen drei Basen unter 0,102 lagen, (spez. Adenin-extinktion) mit einer Verdünnung von 1 : 200 erreicht.

Zur Herstellung eines Eichgemisches, bestehend aus Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin, wurden gleiche Volumina der gelösten Basen gemischt. Die Konzentration betrug 1 mg pro ml und in 0,01 ml befanden sich wiederum 10×10^{-6} g. Danach wurden insgesamt 40×10^{-6} g, das heißt, 0,04 ml mit der Agla-Spritze pro Fleck aufgetragen.

Die getrennten Einzelbasen wurden mit dem Säulenverfahren extrahiert, während beim Eichgemisch beide Extraktionsmethoden, das heißt, die direkte und die stufenweise Extraktion angewendet und in ihrer Arbeitsweise anschließend gegenübergestellt wurden.

Die aufgetragene Konzentration pro Base wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Die einzelnen Extinktionen konnten mit Hilfe der von Wyatt angegebenen spezifischen Extinktionen für die Einzelbasen berechnet werden. Diese von Wyatt angegebenen spezifischen Extinktionen wurden bei einer früheren, von unserem Arbeitskreis durchgeführten, quantitativen Basenanalyse einer *Holothuria polii* etwas korrigiert. Für Adenin, Guanin und Thymin fand sich eine geringe Erhöhung der spezifischen Extinktionen (s. Tabellenvergleich).

Zur prozentualen Ausbeuteberechnung für die einzelnen Basen habe ich die von uns für die bei unseren Bedingungen ermittelten spezifischen Extinktionen für 1×10^{-6} g Base pro ml herangezogen.

Die Extinktion ist von Lampert und Beer wie folgt definiert:¹⁹

$$\text{Extinktion} = \log \frac{I_0}{I_x} = c \cdot d \cdot k.$$

Symbolerklärung:

I_0 = Fotostrom der ungefärbten Lösung

I_x = Fotostrom der gefärbten Lösung

c = Konzentration

d = Schichtdicke

k = Molarer Extinktions-Koeffizient

Die von Wyatt angegebenen spezifischen Extinktionen:^{6,18}

Substanz	Lösungsmittel	Wellenlänge $m\mu$	Millimolarer E bei Extinktions- Koeffizient	0,001 % pro 1 ml
Adenin	0,1-n HCl	260	13,0	0,96
Guanin	0,1-n HCl	250	11,0	0,73
Thymin	0,1-n HCl	265	7,95	0,63
Cytosin	0,1-n HCl	275	10,5	0,95

Die von uns herausgefundenen und bei den Messungen und Berechnungen zu Grunde gelegten Extinktionen:

Substanz	Lösungsmittel	Wellenlänge my	Millimolarer E bei Extinktions- Koeffizient	0,001 % pro 1 ml
Adenin	1-n HCl	262	13,0	1,02
Guanin	1-n HCl	250	11,0	0,77
Thymin	1-n HCl	265	7,95	0,64
Cytosin	1-n HCl	275	10,5	0,95

Ausbeuteberechnung für nur eine pro Chromatogramm aufgetragene und entwickelte Base.

Pro Fleck wurden 10×10^{-6} g aufgetragen. Das Gesamtvolumen des Eluats betrug pro Fleck $3,55 \pm 0,05$ ml. Dividiert man nun die Auftragekonzentration pro Fleck durch das Gesamtvolumen des Eluats, so erhält man die Konzentration für 1 ml Eluat. In unserem Versuch mußten nach Division $2,82 \times 10^{-6}$ g Base pro ml = 100 Prozent enthalten sein. Das entsprach folgenden Extinktionen, wobei die Werte für die einzelnen Basen gleich 100 Prozent gesetzt waren. Betrug in unserem Versuch für jede Base die Konzentration $2,82 \times 10^{-6}$ g pro ml, so errechnete sich die dieser Konzentration entsprechende Extinktion wie folgt:

Beispiel Adenin:

spezifische Extinktion für 10^{-6} g pro ml = 0,102

$$2,82 \times 10^{-6} \text{ g pro ml} = 0,102 \times 282 = 0,288$$

Substanz	Konzentration in y/ml = 100%	spez. Wellen- länge in m μ	E bei $2,82 \times 10^{-6}$ g pro ml = 100 %
Adenin	2,82	262	0,288
Guanin	2,82	250	0,217
Thymin	2,82	265	0,181
Cytosin	2,82	275	0,270

Die nach Extraktion pro 10×10^{-6} g Auftragekonzentration für eine Base erhaltenen Extinktionen ergaben folgende prozentuale Ausbeutewerte:

Substanz	Fleck 1	Fleck 2	Fleck 3	Mittelwert
Adenin	101,1 %	97,9 %	91,2 %	96,7 %
Guanin	105,0 %	97,2 %	106,8 %	103,0 %
Thymin	101,1 %	92,8 %	97,2 %	97,1 %
Cytosin	108,2 %	100,5 %	88,8 %	99,1 %

j. Berechnung der Streuung

Die Berechnung der Streuung, sowohl der Einzelbasen als auch des Eichgemisches, erfolgte nach der auf Seite 14 angegebenen und am Beispiel erläuterten Formel.

Streuung der Einzelbasen bei Mittelwert = 100 Prozent

Guanin	= s = $\pm$ 5,10 % ;	W = 100,3 % $\pm$ 5,10 %
Adenin	= s = $\pm$ 5,51 % ;	W = 96,7 % $\pm$ 5,51 %
Thymin	= s = $\pm$ 4,02 % ;	W = 97,1 % $\pm$ 4,02 %
Cytosin	= s = $\pm$ 10,40 % ;	W = 99,1 % $\pm$ 10,40 %

Unter W verstehen wir die Summe von Mittelwert $\pm$ Streuung

W = Mittelwert $\pm$ Streuung.

Streuung des Eichgemisches

6 Versuche Ausstreich-Methode

Guanin	= s = $\pm$ 7,65 %	W = 95,2 % $\pm$ 7,65 %
Adenin	= s = $\pm$ 7,11 %	W = 89,7 % $\pm$ 7,11 %
Thymin	= s = $\pm$ 6,52 %	W = 96,6 % $\pm$ 6,52 %
Cytosin	= s = $\pm$ 6,73 %	W = 82,7 % $\pm$ 6,73 %

Streuung des Eichgemisches

5 Versuche Sprüh-Methode

Guanin	= s = $\pm$ 10,7 %	W = 97,4 % $\pm$ 10,7 %
Adenin	= s = $\pm$ 3,0 %	W = 88,0 % $\pm$ 3,0 %
Thymin	= s = $\pm$ 6,6 %	W = 95,7 % $\pm$ 6,6 %
Cytosin	= s = $\pm$ 11,5 %	W = 84,2 % $\pm$ 11,5 %

k. Vergleich der Streuung zwischen den mit der Ausstreich- oder Sprüh-Methode hergestellten Platten.

Die Streuungsberechnung der einzelnen Basen bezog sich für die Ausstreich-Methode auf nachfolgendes Versuchsprotokoll. Von jeder Platte erhielt man zwei Extraktionen. Die Extraktion der zwei Basenreihen wurde parallel vorgenommen, bei gleicher Zeitdauer und gleicher Zimmertemperatur. Es wurden insgesamt 6 Säulenextraktionen vorgenommen.

Schließlich sei dieser Tabelle aus Vergleichsgründen noch das Versuchsprotokoll für die Sprüh-Methode angefügt. Die Extraktion erfolgte bei den mit der Sprüh-Methode hergestellten Platten ebenfalls wie bei der Ausstreich-Methode an der Säule unter sonst völlig gleichen Bedingungen.

Versuchsprotokoll über 6 Säulenextraktionen bei der Ausstreich-Methode.

Extraktion a			Extraktion b	
6.11.63	Ext. - LW	%	Ext. - LW	%
Gu =	0,215	97,7	0,207	94,2
Ad =	0,285	98,3	0,287	98,9
Thy =	0,153	85,0	0,149	82,0
Cyt =	0,203	75,2	0,210	77,7
7.11.63				
Gu *	0,224	101,8	0,224	101,8
Ad =	0,253	87,2	0,252	87,2
Thy =	0,165	90,6	0,161	88,4
Cyt =	0,232	85,8	0,235	87,2
14.11.63				
Gu =	0,173	80,8	0,203	94,8
Ad =	0,224	79,2	0,246	86,9
Thy =	0,138	77,6	0,171	96,0
Cyt =	0,210	79,5	0,241	91,2

Der Leerwert (LW) gibt die erhaltene Extinktion eines parallel zur Basenextraktion mitextrahierten Leerfleckens an.

Tabelle der Mittelwerte $\pm$ Streuung der Einzelbasen nach Säulenextraktion bei mit Ausstreich-Methode hergestellten Platten.

Wert	=	Mittelwert	$\pm$	Streuung
Guanin		95,2 %		7,65 %
Adenin		89,7 %		7,11 %
Thymin		86,6 %		6,52 %
Cytosin		82,7 %		6,73 %

Versuchsprotokoll über 5 Säulenextraktionen der mit der Sprüh-Methode hergestellten Platten.

Guanin	=	Ext.-LW	E korr. %	Cytosin	=	Ext.-LW	E korr. %
16.10.63	=	0,226	104,1			0,262	97,0
17.10.63	=	0,241	111,1			0,246	91,1
18.10.63	=	0,193	88,9			0,213	78,8
30.10.63	=	0,209	96,3			0,221	81,8
30.10.63	=	0,189	87,1			0,201	74,4
Adenin	=	Ext.-LW	E korr. %	Thymin	=	Ext.-LW	E korr. %
16.10.63	=	0,259	89,3			0,168	92,3
17.10.63	=	0,262	90,3			0,187	102,7
18.10.63	=	0,250	86,2			0,183	100,5
30.10.63	=	0,247	85,1			0,161	88,4
30.10.63	=	0,259	98,3			0,173	95,0

Der Vergleich der Streuung des Eichgemisches bei mit der Ausstreich- und Sprüh-Methode hergestellten Platten ergab eine deutliche Erhöhung der Streuung bei Verwendung von aufgesprützten Schichten. So zeigten zum Beispiel die Streuungen der Basenpartner Guanin und Cytosin besonders deutliche Unterschiede. Die Streuung bei Guanin erhöhte sich unter Verwendung von Sprühplatten von $s = \pm 7,65 \%$ auf $s = \pm 10,7 \%$ und bei Cytosin von $s = \pm 6,73 \%$ auf $s = \pm 11,5 \%$. Dagegen waren die Streuungsdifferenzen der Basenpartner Adenin und Thymin in beiden Methoden annähernd einheitlich (s. Tabelle).

Tabelle der Mittelwerte $\pm$ Streuung der Einzelbasen nach Säulenextraktion bei mit der Sprüh-Methode hergestellten Platten.

Wert	=	Mittelwert	$\pm$	Streuung
Guanin		97,4 %		10,7 %
Adenin		88,0 %		3,0 %
Thymin		95,7 %		6,6 %
Cytosin		84,2 %		11,5 %

1. Berechnung und Streuungsberechnung des Basenquotienten und Basenkorrektur.

Mit Hilfe der alten direkten Extraktions-Methode wurden zunächst 34 Basenbestimmungen durchgeführt. Die erhaltenen korrigierten Extinktionen wurden nun in Bezug gesetzt zur spezifischen Extinktion für 10^{-6} g pro ml der Basen. Betrug zum Beispiel die für Guanin nach Extraktion erhaltene Extinktion 0,154 und war die spezifische Extinktion für 10^{-6} g Guanin pro ml 0,077, so entsprach dies einer Konzentration von 2×10^{-6} g Guanin pro ml.

10^{-6} g Guanin pro ml entspricht aber, bei einem Molekulargewicht von 151,15 für Guanin, einer $1,51 \times 10^{-5}$ molaren Lösung. Multipliziert man nun die herausgefundene Guaninkonzentration pro ml mit dem Faktor 1,51, so erhält man die der Guaninkonzentration in ml entsprechende Molarität $\times 10^{-5}$. Durch Addition aller vier errechneten Basenmole kommen wir zur Molsumme und setzen diese gleich 100 Prozent. Danach konnten die einzelnen Basenmole im Dreisatz mit der Molsumme gleich 100 Prozent ins Verhältnis gesetzt und so ihr prozentualer Anteil angegeben werden. Die Basenquotienten wurden aus den Molprozent der einzelnen Basenpartner, also

$$\frac{\text{Adenin} + \text{Thymin (in Molprozent)}}{\text{Guanin} + \text{Cytosin (in Molprozent)}}$$

berechnet.

Die Berechnung der durch Säulenextraktion ermittelten Basenquotienten schließt sich nachfolgend an.

Formeln zur Berechnung der den einzelnen Basenkonzentrationen in ml entsprechenden Molaritäten $\times 10^{-5}$.

Guanin	=	$\frac{1,51 \times 10^{-5} \times \text{Ext.}}{0,077}$
Cytosin	=	$\frac{1,11 \times 10^{-5} \times \text{Ext.}}{0,095}$
Adenin	=	$\frac{1,35 \times 10^{-5} \times \text{Ext.}}{0,102}$
Thymin	=	$\frac{1,26 \times 10^{-5} \times \text{Ext.}}{0,064}$
5-M-Cytosin	=	$\frac{1,25 \times 10^{-5} \times \text{Ext.}}{0,072}$
Uracil	=	$\frac{1,12 \times 10^{-5} \times \text{Ext.}}{0,071}$

Berechnung der Mol-% und des Basenquotienten an Hand eines willkürlich gewählten Beispielles.

Substanz	Ext.	Mol absol. x 10 ⁻⁵	Mol %	
Guanin	0,089	1,74	23,4	} -Δ 7,7 %
Cytosin	0,101	1,17	15,7	
Adenin	0,175	2,32	31,1	} -Δ 1,3 %
Thymin	0,113	2,22	29,8	
	100 %	7,45	100 %	

$$\text{BQ} = \frac{\overbrace{\text{A} + \text{T}}^{60,9}}{\underbrace{\text{G} + \text{C}}_{39,1}} = 1,557$$

In der nachfolgenden photometrischen Tabelle sind die Mol absolut der einzelnen Basen, die Mol Prozente, die Differenzen zwischen Adenin und Thymin in Prozent, die Differenzen zwischen Guanin und Cytosin in Prozent und die aus dem Verhältnis Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin errechneten Basenquotienten der 34 Versuche nochmals geordnet dargestellt.

TABELLE PHOTOMETRIE

(Rechnungen)

a. Mol absolut

b. Mol-%

Nr.	A	T	G	C	A-T %	G-C %	$\frac{A+T}{G+C}$
1	a. 1,746 b. 32,1%	1,635 30,3%	1,179 22,0%	0,845 15,7%	- Δ 1,8 %	- Δ 6,3 %	1,65
2	a. 2,12 b. 25,5%	2,44 29,3%	2,55 30,6%	1,21 14,6%	+ 3,8 %	- 16,0 %	1,21
3	a. 3,49 b. 31,4%	3,28 29,5%	2,82 25,4%	1,51 13,6%	- 1,9 %	- 11,8 %	1,56
4	a. 1,63 b. 28,6%	1,85 32,3%	1,45 25,4%	0,79 13,8%	+ 3,7 %	- 11,6 %	1,55
5	a. 2,74 b. 33,4%	2,21 27,0%	2,18 26,6%	1,70 13,1%	- 6,4 %	- 13,5 %	1,52
6	a. 1,72 b. 32,6%	1,30 25,0%	1,50 28,8%	0,70 13,4%	- 7,6 %	- 15,4 %	1,37
7	a. 1,83 b. 28,3%	1,97 30,5%	1,61 24,9%	1,05 16,3%	+ 2,2 %	- 8,6 %	1,43
8	a. 2,57 b. 33,8%	1,70 22,4%	2,20 29,0%	1,12 14,8%	- 11,4 %	- 14,2 %	1,28
9	a. 1,51 b. 29,0%	1,52 29,1%	1,41 27,2%	0,77 14,8%	+ 0,1 %	- 12,4 %	1,39
10	a. 2,34 b. 30,8%	2,25 29,6%	1,95 25,7%	1,06 14,0%	- 1,2 %	- 11,7 %	1,52
11	a. 2,30 b. 30,1%	2,05 27,6%	2,00 26,3%	1,20 15,8%	- 2,5 %	- 10,5 %	1,57
12	a. 2,15 b. 37,8%	1,32 23,2%	1,32 23,2%	0,90 15,8%	- 14,6 %	- 7,4 %	1,57
13	a. 2,02 b. 29,6%	2,37 34,8%	1,34 19,7%	1,08 15,9%	+ 5,2 %	- 3,8 %	1,81
14	a. 2,17 b. 27,7%	2,26 28,9%	2,28 29,2%	1,11 14,2%	+ 1,2 %	- 15,0 %	1,31
15	a. 1,70 b. 32,1%	1,46 27,6%	1,48 27,9%	0,66 12,5%	- 4,5 %	- 15,2 %	1,48
16	a. 2,15 b. 32,2%	1,90 28,0%	1,61 23,6%	1,11 16,2%	- 4,2 %	- 7,4 %	1,52
17	a. 1,91 b. 29,2%	1,97 30,1%	1,78 27,3%	0,87 13,3%	+ 0,9 %	- 14,0 %	1,46

Nr.	A	T	G	C	A-T %	G-C %	$\frac{A+T}{G+C}$
18	a. 1,64 b. 31,2%	1,56 29,7%	1,32 25,1%	0,74 14,1%	- Δ 1,5 %	- Δ 11,0 %	1,56
19	a. 2,32 b. 31,1%	2,22 29,8%	1,74 23,4%	1,17 15,7%	- 1,3 %	- 7,7 %	1,56
20	a. 2,18 b. 29,9%	2,13 29,2%	1,97 27,0%	1,02 14,0%	- 0,7 %	- 13,0 %	1,44
21	a. 1,60 b. 26,8%	1,71 28,4%	1,75 29,4%	0,91 15,3%	+ 1,9 %	- 14,1 %	1,24
22	a. 2,24 b. 30,6%	2,19 30,0%	1,92 26,3%	0,95 13,0%	- 0,6 %	- 13,3 %	1,54
23	a. 2,41 b. 34,2%	1,50 21,3%	1,92 27,2%	1,22 17,3%	- 12,9 %	- 9,9 %	1,25
24	a. 1,60 b. 29,5%	1,71 31,5%	1,19 22,0%	0,92 17,0%	+ 2,0 %	- 5,0 %	1,57
25	a. 2,34 b. 29,6%	2,46 31,2%	1,88 23,8%	1,22 15,5%	+ 1,6 %	- 8,3 %	1,55
26	a. 2,94 b. 29,7%	3,00 30,2%	2,46 24,9%	1,49 15,1%	+ 0,5 %	- 9,8 %	1,50
27	a. 1,60 b. 31,0%	1,60 31,0%	1,30 25,1%	0,67 12,9%	± 0,0 %	- 12,2 %	1,63
28	a. 1,75 b. 32,4%	1,58 29,3%	1,30 24,1%	0,77 14,3%	- 3,1 %	- 11,8 %	1,61
29	a. 1,95 b. 32,1%	1,80 29,6%	1,47 24,2%	0,86 14,2%	- 2,5 %	- 10,0 %	1,61
30	a. 1,71 b. 26,1%	1,81 27,6%	1,88 28,7%	1,16 17,7%	+ 1,5 %	- 11,0 %	1,16
31	a. 2,26 b. 31,4%	2,36 32,7%	1,61 22,3%	0,98 13,6%	+ 1,3 %	- 8,7 %	1,78
32	a. 2,15 b. 30,1%	2,21 30,9%	1,85 25,9%	0,94 13,2%	+ 0,8 %	- 12,7 %	1,56
33	a. 3,10 b. 30,1%	3,25 31,5%	2,69 26,1%	1,31 12,7%	+ 1,4 %	- 13,4 %	1,59
34	a. 3,20 b. 30,0%	3,16 29,7%	2,82 26,5%	1,47 13,8%	- 0,3 %	- 12,7 %	1,48

Der nach der Tabelle gefundene mittlere Basenquotient betrug 1,48. Die mittlere Abweichung zwischen Adenin und Thymin 1,80 % und die zwischen Guanin und Cytosin 11,20 %. Die mittlere Abweichung zwischen Adenin und Thymin konnte aber auf Grund der geringen Prozentzahl von nur 1,80 % vernachlässigt werden. Dagegen bedingte die große Differenz zwischen Guanin und Cytosin gleich 11,20 % eine Korrektur des mittleren Basenquotienten.

Rechnung: Basenkorrektur

$$\text{Guanin} + \text{Cytosin} = 200 \% - 11,20 \% = 188,80 \%$$

$$\frac{200,00 \%}{188,80 \%} = 1,058$$

$$\text{BQ} - \text{Korrektur} = \frac{1,48}{1,058} = 1,399$$

Der durch Korrektur gefundene Basenquotient betrug also

$$\begin{array}{c} 1,399. \\ ===== \end{array}$$

Berechnung der Streuung des Basenquotienten.

$$s^2 = \frac{1}{33} (75,78 - 1,48 \cdot 50,58)$$

$$s^2 = 0,0278$$

$$s = \pm \sqrt{0,0278}$$

$$s = \pm 0,167$$

$$W = 1,399 \pm 0,167$$

Streuungsrechnung der Basenquotienten bei Säulen- extraktion.

Die nachfolgende Tabelle und die anschließenden Berechnungen beziehen sich auf eine Serie von sechs Versuchen. Wie oben bei der alten Basenquotientenbestimmung soll auch in diesem Falle eine genaue Tabelle das Zustandekommen der Basenquotienten erläutern.

Nr.	A.	T.	G.	C.	A - T %	G - C %	$\frac{A + T}{G + C}$
1 a.	3,58	3,35	3,27	1,44	- 2,0 %	- 15,7 %	1,47
b.	30,8%	28,8%	28,1%	12,4%			
2 a.	2,82	3,24	2,42	1,81	+ 4,1 %	- 5,9 %	1,44
b.	27,4%	31,5%	23,5%	17,6%			
3 a.	3,72	3,04	3,40	1,38	- 5,7 %	- 17,7 %	1,42
b.	32,2%	26,5%	29,5%	11,8%			
4 a.	3,28	3,70	2,55	1,18	- 2,2 %	- 13,5 %	1,71
b.	32,6%	30,4%	25,2%	11,7%			
5 a.	3,30	3,25	3,20	1,20	- 0,3 %	- 18,2 %	1,49
b.	30,0%	29,7%	29,1%	10,9%			
6 a.	3,26	3,48	2,98	1,48	+ 2,0 %	- 13,4 %	1,51
b.	29,1%	31,1%	26,6%	13,2%			

Zeichenerklärung: a. = Mol absol. b. = Molprozent

Die Gesamtsumme der Basenquotienten betrug 9,04.
Der daraus errechnete mittlere Basenquotient 1,506.
Die mittlere Abweichung zwischen Guanin und Cytosin war mit 14,05 % etwas höher als bei der alten Extraktionsmethode.

Streuungsrechnung

n = 6 Versuche

Mittlerer Basenquotient = 1,506

Quadratsumme der Basenquotienten = 13,8

Summe der Basenquotienten = 9,04

Daraus folgt:

$$s^2 = \frac{1}{5} (13,8 - 1,5 \times 9,04)$$

$$s^2 = 0,048$$

$$s = \pm \sqrt{0,048}$$

$$s = \pm 0,22$$

Auf Grund der erheblichen Differenz zwischen Guanin und Cytosin (14,1 Prozent) wurde auch anschließend wieder eine Basenkorrektur vorgenommen.

Basenkorrektur

Guanin + Cytosin = 200 - 14,1 = 185,9

200 : 185,9 = 1,076

$$\frac{1,506}{1,076} = 1,40$$

$$M = 1,40 \pm 0,22$$

Die bei allen Versuchen beobachtete Differenz zwischen Guanin und Cytosin verlangte eine nähere Untersuchung dieser beträchtlichen Verlustquote. Es wurde deshalb angenommen, daß diese Substanz hauptsächlich beim Markierungsschritt verlorenging. Man stützte sich dabei vor allem auf Literaturangaben anderer Autoren, die behaupteten, daß bei Einwirkung von UV-Licht²⁰ aus der HCl des Wyatt-Gemisches Chlor entstehe, welches besonders das Cytosin angreift.

Aus diesem Grunde wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, wobei man die Platten verschieden lang mit UV belichtete. Die Standardzeit, die zum Markieren einer Platte benötigt wurde, betrug 30 sec. Innerhalb dieser Zeitspanne konnten die Flecken gewissenhaft voneinander abgegrenzt werden. So wurde die erste Platte 30 sec., die zweite 60 sec. und die dritte das Vierfache der Standardzeit, also 2 Minuten lang belichtet. Nach der Extraktion des Cytosinfleckens konnte aber überhaupt kein Substanzverlust nachgewiesen werden. Da aber bei sämtlichen Markierungsschritten niemals länger als eine Minute belichtet wurde, konnte also das auf Cytosin einwirkende UV-Licht nicht für die Differenz verantwortlich gemacht werden.

Tabelle der von Cytosin nach Bestrahlung von UV-Licht erhaltenen Extinktionen.

Versuch	30 sec. UV	60 sec. UV	120 sec. UV
a.	0,243	0,263	0,242
b.	0,247	0,264	0,274

- m. Bestimmung des Stickstoff/Phosphorverhältnisses^{22,23} der *Holothuria tubulosa* DNA.

Der Bestimmung des Basenquotienten der *Holothuria tubulosa* DNA schlossen sich zwecks Ermittlung des Stickstoff/Phosphorverhältnisses mehrere Phosphorbestimmungen nach Allen und Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl an. Wie aus dem Versuchsprotokoll ersichtlich ist, konnte bei diesen Bestimmungen auf Grund ihrer großen Genauigkeit und ganz geringen Abweichung der Werte auf eine größere Versuchsreihe verzichtet werden.

Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl

$$\begin{array}{ll} L_1 = 9,67 & \\ L_2 = 9,64 & M = 9,655 \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} V_{1a} = 8,20 & \\ V_{1b} = 8,21 & M = 8,205 \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} V_{2a} = 7,43 & \\ V_{2b} = 7,43 & M = 7,430 \end{array}$$

$$L - V_1 = 1,450 \qquad L - V_2 = 2,225$$

$$V_1 = 1,450 \cdot 0,14 = 0,213 : 2 = 0,1065$$

$$V_2 = 2,225 \cdot 0,14 = 0,312 : 3 = 0,1040$$

In 1 mg DNA/ml sind 105×10^{-6} g Stickstoff enthalten.

Erläuterung zur Berechnung des Stickstoffes.²¹

1 ml n/100 H_2SO_4 entspricht $140 \cdot 10^{-6}$ g Stickstoff.

Bei Veraschung von 1 ml DNA-Lösung ergibt also die Zahl der verbrauchten ml n/100 H_2SO_4 mit dem Faktor 0,14 multipliziert den Stickstoffgehalt in $1000 \cdot 10^{-6}$ g DNA/ml.

Phosphatbestimmung nach Allen

Ext.

$$\begin{array}{ll} L_1 = 0,002 & \\ L_2 = 0,003 & M_{Ext} = 0,0025 \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} V_{1a} = 0,5 \text{ ml DNA} = 0,174 & \\ V_{1b} = 0,5 \text{ ml DNA} = 0,182 & M_1 = 0,1780 \end{array}$$

$$\begin{array}{ll} V_{2a} = 1,0 \text{ ml DNA} = 0,354 & \\ V_{2b} = 1,0 \text{ ml DNA} = 0,355 & M_2 = 0,3545 \end{array}$$

	Ext.		Ext.
M_1	= 0,1755		0,176
M_2	= 0,3520	aufgerundet	0,352

An Hand der Standardkurve abgelesene Konzentrationen.

V_1 = 0,176 bei 0,5 ml DNA = $35 \cdot 10^{-6}$ g Phosphor

V_2 = 0,352 bei 1,0 ml DNA = $70 \cdot 10^{-6}$ g Phosphor

Das aus diesen Daten kalkulierte Gewichtsverhältnis Stickstoff/Phosphor betrug 1,500.

Das theoretische an Hand der Nucleotidformel errechnete Stickstoff/Phosphorverhältnis beträgt aber 1,67. Eine nachträglich im analytischen Labor der Farbwerke Hoechst AG durchgeführte Bestimmung des Stickstoff/Phosphorverhältnisses ergab einen Quotienten von $1,72 \pm 0,03$. Dieses Ergebnis stimmt annähernd mit dem theoretisch errechneten Wert überein. Somit ist das von uns angegebene Stickstoff/Phosphorverhältnis im Vergleich zu dem theoretisch ermittelten Wert um 10,2 Prozent zu niedrig. Es ist daher anzunehmen, daß die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl nicht alle in der heterozyklischen Struktur der Purin- und Pyrimidinbasen eingebauten Stickstoffatome freisetzt und erfaßt.

An dieser Stelle sei Herrn Dr. Kelber vom Analytischen Laboratorium der Farbwerke Hoechst AG für die freundliche Unterstützung und Ausführung der oben angeführten Bestimmung des Stickstoff/Phosphorverhältnisses recht herzlich gedankt.

III. DISKUSSION

Eine quantitative Basenanalyse einer *Holothuria tubulosa* DNA mittels der Dünnschichtchromatographie wurde durchgeführt und dem herkömmlichen, mit vielen Fehlern behafteten, Verfahren der Papierchromatographie gegenübergestellt.

Hierbei ergaben sich wesentliche Vorzüge der Dünnschichtchromatographie. Diese Vorzüge sollen in den Hauptpunkten noch einmal angeführt werden. Zur Entwicklung eines Papierchromatogrammes benötigte man große Chromatographiegefäße und lange Laufzeiten. Die zu trennenden Substanzen mußten großflächig aufgetragen werden und dadurch entstanden häufig lästige Verzerrungen. Als störend erwiesen sich ebenfalls nach Entwicklung der langwierige Trocknungsprozeß, die Sichtbarmachung mit verschiedenen Sprühmitteln und die kostspielige Dokumentation mit dem Fotoprintverfahren.

Dagegen hat die Dünnschichtchromatographie folgende Vorteile:

1. Die Raumersparnis durch die kleinen Chromatographiekammern
2. die dadurch verbundene Möglichkeit der Parallelentwicklung vieler Versuche zur gleichen Zeit
3. das kleine Format der Dünnschichtchromatogramme bei hoher Auflösung
4. der bis auf Quadratmillimeter reduzierbare Auftragspunkt
5. die kurze Entwicklungszeit von nur 4 - 5 Stunden
6. die schnelle Dokumentation der aufgetrennten Substanzen durch die Direktfotografie
7. die bedeutende Materialersparnis durch Wiederverwendung der gebrauchten und gereinigten Glasplatten
8. die günstige Aufbewahrung derselben in Plattenschränken

Bei der Herstellung der Dünnschichtchromatogramme standen verschiedene Beschichtungsmittel zur Verfügung. So wurden anorganische (Kieselgel-G), ionenaustauschende (Ecteola und DEAE) sowie organische (Cellulose MN - 300) Beschichtungsmittel auf ihre Trennbarkeit durchgetestet, wobei an der Cellulose MN - 300-Schicht besonders günstige Ergebnisse erzielt wurden.

Letzte Verzerrungen konnten durch Veränderung der Azidität unseres Lösungsmittels (Wyatt-Gemisch) behoben werden.

Wasser, 1 n-HCl und Na Cl trennten trotz anderslautender Literaturangaben mit Ecteola und Kieselgel-G nicht.

Eine zu Beginn der Versuche feststellbare Verunreinigung der Celluloseschicht konnte durch einen Vorwaschprozeß abgestellt werden.

Nach diesen Versuchen ergaben sich klare, gut voneinander abgrenzbare Trennungen. Dies wird durch die fotografische Dokumentation belegt.

An Hand eines mitgelaufenen Eichgemisches, bestehend aus den fünf Basen Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin und Uracil, konnte eine Verunreinigung unseres *Holothuria tubulosa* DNA Hydrolysates durch Uracilspuren ausgeschlossen werden.

So konnte mit größter Sicherheit geschlossen werden, daß die vorliegende *Holothuria tubulosa* DNA hochrein ist und sich aus den klassischen vier Basenpaaren Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin zusammensetzt.

Das Vorhandensein von 5-Methyl-Cytosin konnte ebenfalls durch ein hierfür entwickeltes Rechromatographieverfahren verneint werden.

Zur Herstellung der Platten standen die Ausstreich- und Sprühhmethode zur Verfügung. An Hand der zahlreichen Ausbeuteberechnungen mußte der Ausstreichmethode ein wesentlicher Vorteil gegenüber der Sprühhmethode eingeräumt werden.

Die getrennten Substanzen konnten mittels einer UV-Emissions-Lampe für den Bereich zwischen 400 - 14 mμ dargestellt und auf einfache Weise mit einem Bleistift unter der UV-Lampe markiert werden.

Bei der Extraktion der Basen kamen die direkte und die stufenweise Säulenextraktion zur Anwendung. Dabei brachte die stufenweise Extraktion die besten Ergebnisse.

Nach Entwicklung und Extraktion von verschiedenen hydrolysierten Einzelbasen fanden sich folgende mittleren Ausbeutewerte:

Adenin:	96,7 %	Guanin:	103,0 %
Thymin:	97,1 %	Cytosin:	99,1 %

Die Ausbeuteberechnung eines hydrolysierten Eichgemisches, bestehend aus den vier Basenpartnern Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin, ergab für

Adenin:	89,7 % $\pm$ 7,11 %
Guanin:	95,2 % $\pm$ 7,65 %
Thymin:	96,6 % $\pm$ 6,52 %
Cytosin:	82,7 % $\pm$ 6,73 %

Bei der Entwicklung und Extraktion der hydrolysierten Eichgemische ergaben sich zwar für alle Basenpartner Verluste, diese wiesen aber eine geringere Fehlerbreite als bei der Papierchromatographie auf.

Zur Bestimmung des Basenquotienten der *Holothuria tubulosa* DNA wurden 34 Versuche durchgeführt. Dabei fand sich nach Cytosin-Korrektur ein Basenquotient $1,40 \pm 0,22$. Dieser Basenquotient entspricht ebenfalls annähernd der vom Labor Zahn durchgeführten Basenanalyse einer *Holothuria polii* DNA.

Für die den Holothurien in der zoologischen Systematik nahestehenden Seeigel fand sich ein Basenquotient von 1,5 bis 1,8. Der vorliegende Basenquotient läßt sich also gut dem bereits bekannten Basenquotienten des Tierstammes der Echinodermata angliedern.

In der Sueoka-Tabelle werden für die Invertebrates Molsummen von Guanin und Cytosin zwischen 34 und 44 Prozent angegeben. Der für die *Holothuria tubulosa* errechnete Wert von $40,35 \pm 2,51$ Prozent reiht sich ebenfalls in die Mitte der Invertebraten-spalte ein.

Das Gewichtsverhältnis Stickstoff zu Phosphor betrug 1,500 und liegt damit 10,2 Prozent unter dem theoretisch kalkulierten Wert von 1,67. Man kann daher annehmen, daß die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl nicht alle in der heterozyklischen Struktur der Purin- und Pyrimidinbasen eingebauten Stickstoffatome erfaßt.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Methode zur Trennung von Purin- und Pyrimidinbasen mittels der Dünnschichtchromatographie wurde ausgearbeitet. Als Schicht wurde MN-300 Cellulosepulver benutzt.

Das Lösungsmittel war modifiziertes Wyatt-Gemisch.

Beim Auftragen der Celluloseschicht auf die Glasplatten erwies sich das Ausstreichgerät vorteilhafter als das Sprüngerät.

Nach 4 - 5 stündiger Entwicklung konnten die klar voneinander getrennten Basen mit dem UV-Licht und fotografisch nachgewiesen werden.

Die alte Extraktionsmethode wurde durch die stufenweise Säulenextraktion abgelöst und verbessert.

Eine quantitative Basenanalyse einer DNA aus *Holothuria tubulosa* wurde durchgeführt.

Der errechnete Basenquotient betrug $1,40 \pm 0,22$.

Das Stickstoff/Phosphorverhältnis war 1,500.

V. LITERATURANGABEN

1. E. Chargaff u. I.N. Davidson, The Nucleic Acids Academic Press New York - Band I 1 - 7 (1955)
2. H.M. Rauen, Biochem. Taschenbuch, 2. Auflage S. 735
3. Karlson, Kurzgef. Lehrbuch der Biochemie S. 91 - 101 (1961)
4. R.K. Zahn, A. Docter u. H. Müller, Zeitschrift für Naturforschung 13 b S. 404 - 407 (1958)
5. E. Chargaff, R. Lipshitz u. C. Green, J. biol. Chemistry, 195, 155 (1952)
6. G.R. Wyatt, Biochem. J. 48 S. 584 (1951)
7. M.M. Daly, V.G. Allfrey u. A.E. Mirsky, J. gen. Physiol. 33 S. 497 (1950)
8. S. Hörstadius, I.J. Lorch u. E. Chargaff, Exp. Cell. Res. 6 S. 440 (1954)
9. I.D. Watson u. F.H.C. Crick, Nature (London) 171 S. 737 (1953)
- fd* 10. I.D. Watson u. F.H.C. Crick, Cold Spring Harbor Sympos. quantitat. Biol. 18 S. 123 (1953)
11. H.M. Rauen, Biochem. Taschenbuch, 2. Auflage S. 742
12. E. Stahl, Lehrbuch der Dünnschichtchromatographie
13. E. Stahl, Angewand. Chemie, 73 S 646 (1961)
14. E. Stahl, Z. anal. Chemie, 181 S. 303 (1961)
15. P. Wollenweber, J. of Chromatog. 7 S. 557 - 560 (1962)
16. P. Wollenweber, J. of Chromatog. 9 S. 369 - 371 (1962)

17. E. Chargaff u. I.N. Davidson, The Nucleic Acids Academic Press New York - Band I S. 248 - 257 (1955)
18. E. Chargaff u. I.N. Davidson, The Nucleic Acids Academic Press New York - Band I S. 257 - 264 (1955)
19. Hoppe-Seyler-Thierfelder, 10. Auflage, Band I S. 312
20. E. Chargaff u. I.N. Davidson, The Nucleic Acids Academic Press New York und London - Band III S. 63 - 79 (1960)
21. I.K. Parnas u. R. Wagner, Biochem. J. 125, S. 253 (1921)
22. R.I.L. Allen, Biochem. J. 30 S. 858 (1940)
23. Hoppe-Seyler-Thierfelder, Handbuch d. physiol. u. patmol.-chem. Analyse, 10. Auflage - Band III/Erster Bandteil S. 236
24. Claus-Grobbe-Kühn, Lehrbuch der Zoologie (1932)
25. R.K. Zahn, E. Tiesler, A.K. Kleinschmidt u. D. Lang Biochem. Zeitschrift 336 S. 281 - 298 (1962)

VI. SYMBOL - TABELLE

1. DNA	= Bezeichnung des anglosächs. Sprachraumes für Desoxyribonucleinsäure
2. RNA	= Bezeichnung des anglosächs. Sprachraumes für Ribonucleinsäure
3. Basen	= Bezeichnung für die Aminopurine Adenin und Guanin und die Aminopyrimidine Thymin und Cytosin
4. Basenquotient	= Bezeichnung für den Quotienten aus $\frac{\text{Adenin} + \text{Thymin}}{\text{Guanin} + \text{Cytosin}}$
5. A = Adenin	= 6- Aminopurin
6. G = Guanin	= 2- Amino- 6- Hydroxypurin
7. C = Cytosin	= 2- Hydroxy- 4- aminopyrimidin
8. T = Thymin	= 5- Methyl- 2,4- dihydroxypyrimidin
9. U = Uracil	= 2,4- Dihydroxypyrimidin
10. 1 Mol	= soviel Gramm einer Substanz, wie ihr Molekulargewicht angibt
11. Molsumme	= die Summe der in einem Versuch ermittelten vier Basenmole
12. Molarität od. molekul. Konzentration eines Stoffes	= gibt an, wieviel Mole oder Bruchteile eines Moles in einem Liter enthalten sind
13. 10^{-6} g	= 1 Gamma
14. my	= 10^{-6} cm
15. g	= physik. Symbol für die Fallbeschleunigung
16. s	= Streuung
17. Ext.	= Bezeichnung für die Extinktion = $\log \frac{I_0}{I_x} = \text{c.d.k.}$
18. W	= Bezeichnung für Gesamtwert bestehend aus Mittelwert + Streuung

- 19. L = LW = Bezeichnung für Leerwert
- 20. V = Bezeichnung für Versuch
- 21. M = Bezeichnung für den Mittelwert
- 22. UV-Lampe = Emissionslampe für den ultravioletten
Bereich zwischen 400 - 14 my

An dieser Stelle möchte ich
Herrn Prof. Dr. R.K. Zahn für
die freundliche Überlassung
des Themas, seine Hilfe und
Führung durch die Arbeit, sowie
für viele wertvolle Anregungen
für Studium und ferneres Berufs-
leben danken.

Lebenslauf

Am 5. Februar 1940 wurde ich, Manfred Rieger, in Wiesbaden als Sohn des Josef Rieger und seiner Ehefrau Adelheid geb. Forst geboren.

1946 bis 1948 besuchte ich die Hebbel-Volksschule in Wiesbaden, 1948 bis 1951 die Volksschule in Schlüchtern (Oberhessen). Ostern 1951 wurde ich Schüler des Ulrich von Hutten Realgymnasiums, das ich im Sommer 1953 verließ, um bis 1960 in Limburg (Lahn) in die Tilemann-Schule (Gymnasium für Jungen) zu gehen.

Im Frühjahr 1960 bestand ich dort die Reifeprüfung und begann danach mein Medizin-Studium an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt (Main).

Die ärztliche Vorprüfung bestand ich am 11.10.1962 in Frankfurt (Main).

Die klinischen Semester absolvierte ich ebenfalls an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt (Main).

Zur Zeit befinde ich mich ein Semester vor dem medizinischen Staatsexamen.

Wiesbaden-Biebrich

im August 1965

Meine akademischen Lehrer waren:

a. Vorklinisch

Czerny
Dänzer
Frick
Giersberg
Greven
Halbsguth
Heinz
Kramp
Kummer

Müser
Ortmann
Ried
Rosenstock
Royen
Starck
Wezler
Wieland
Zahn

b. Klinisch

Altmann
Amelung
Artelt
Betke
Boenninghaus
Brehm
Cramer
Degkwitz
Fischer
Frey
Frick
Frowein
Geißendörfer
Gerchow
Grüner
Güntz
Heintz
Heller
Hellriegel
Hermann
Herzberg
Hirsch
Hoff
Holtz
Käser
Krücke
Kulenkampff
Landes

Lapp
Leiber
Leonhardi
Lewin
Lieb
Martin
Mittermaier
Otto
Pirlet
Radenbach
Rajewsky
v. Rechow
Róka
Rossberg
Rotter
Schmith
Schobert
Schümann
Schwenzer
Starck
Strnad
Thiel
Ungeheuer
Weber
Weiße
Westermann
Zimmermann
Zutt

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt (Main) zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Die quantitative Basenanalyse der Desoxyribonucleinsäure von *Holothuria tubulosa* mittels der Dünnschichtchromatographie

im Institut für vegetative Physiologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R.K. Zahn ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt (Main)
im August 1965

Manfred Rieger

